

クモ膜下腔へのラット胎仔脳細胞の移植

著者	京唄 和光
発行年	1993-12-17
URL	http://hdl.handle.net/10422/1984

氏名・(本籍)	京 篤 和 光 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士 (論) 第136号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成5年12月17日
学 位 論 文 題 目	クモ膜下腔へのラット胎仔脳細胞の移植 1 脳移植における移植組織の成育とアストロサイトの反応性 Part I : ラット胎仔脳組織塊の大脳皮質内、側脳室内、クモ膜下腔および大脳皮質cavity内への移植 2 脳移植における移植組織の成育とアストロサイトの反応性 Part II : 細胞浮遊法によるラット胎仔脳細胞のクモ膜下腔への移植 3 クモ膜下腔へのラット胎仔前脳基底部細胞の移植 —前脳基底部破壊による受動的回避学習障害の改善—
	審 査 委 員 主査 教授 前 田 敏 博 副査 教授 挾 間 章 忠 副査 教授 半 田 譲 二

論 文 内 容 要 旨

[目 的]

アルツハイマー病の病態解明の進歩を基に、記憶障害モデルラットを作成し、脳移植によって改善を得た報告が散見される。改善のメカニズムは十分には解っていないが、これまでは移植細胞からのシナプス形成による神経回路網の再構築に重点を置き、脳実質内に移植された。しかし、大脳皮質に広範に変性が進行するアルツハイマー病ではおのずと制約が生じる。移植細胞からの神経伝達物質やその合成酵素、各種の栄養因子などの供給も改善の大きな要因と考えられ、より安全で効果的な移植法の開発が要求される。胎仔脳細胞を大脳皮質内、脳室内およびクモ膜下腔に移植し、移植細胞の成育、神経線維の伸長、アストロサイトの反応性を組織学的に検討し、さらに記憶障害ラットの症状改善に有効であるかを検討した。

[方 法]

まず実験1では、成SDラットの大脳皮質内、側脳室内、クモ膜下腔、および大脳皮質に10日前にあらかじめcavityを作成しておいた中に、同種ラット胎仔の前脳基底部より得た小組織塊を移植した。次に実験2では、胎仔より摘出した前脳基底部組織をメッシュを通しピペッティングにて細胞をバラバラにし、その浮遊液を経皮的にクモ膜下腔に刺入した移植針を通して成ラットのクモ膜下腔に移植した。最後に実験3では、ラットの左前脳基底部をカイニン酸で破壊し記憶障害モデルを作成、胎仔前脳基底部細胞を実験2と同様にしてクモ膜下腔に移植した。移植8週間後に明暗箱を用いて受動的回避学習を行い、学習の獲得および保持について検討した。獲得試行はラットを明室に入れ暗室に入るまでの時間を測定し、電気ショックを与えて直ちに取り出した。基準反応潜時300秒に達するまで10～15分ごとに試行を繰り返した。獲得試行の24時間後と48時間後に再生試行を行った。同一月齢

の未処置ラットを正常対照とし、前脳基底部破壊のみのラットを処置対照として比較した。組織学的検討は灌流固定後、ニッスル染色、コリンエステラーゼ染色、グリア線維性酸性蛋白 (GFAP) 免疫染色、コリンアセチルトランスフェラーゼ免疫染色などにより移植部を観察し、移植細胞の生着・成育状態、神経線維の伸長、反応性アストロサイトの動態などについて検討を加えた。

[結 果]

大脳皮質内移植では移植片周囲に比較的厚いグリア瘢痕が形成され、再生神経線維の伸展が阻止された。脳室内移植では移植片の成育は良好で、GFAP陽性アストロサイトは髄液腔に面した周辺に多数認められた。クモ膜下腔への移植でも、アストロサイトは脳表軟膜接触部で少なく、髄液腔に面した周辺部や新生血管周囲に集簇する傾向にあった。大脳皮質cavity内への移植では移植片と宿主との間に著明なグリア性および結合組織性瘢痕形成が見られ、線維進入が阻止されたが、ある例では束になった神経線維がアストロサイトの突起に伴うようにして、宿主側へhyperinnervateしているのが観察された。細胞浮遊法によるクモ膜下腔への移植では、脳表に沿って移植細胞が成育し豊富な神経線維を伸ばし、コリンアセチルトランスフェラーゼ免疫陽性細胞も散見された。大脳皮質内針刺入路にも移植細胞やその再生線維が認められ、血管壁に沿って伸展している線維も確認されたが、ごくわずかであった。脳表のグラフトから正常軟膜を貫通して進入する神経線維は確認されなかった。グラフト内には豊富な血管新生が観察された。前脳基底部へのカイニン酸注入によって多数のコリン作動性ニューロンが変性脱落し、それに伴って大脳皮質でのコリンエステラーゼ陽性線維が著明に減少した。そして受動的回避学習では、学習の獲得および24時間後、48時間後の記憶保持が正常対照群と比べ有意に障害された。一方、移植群では学習の獲得障害には改善が見られなかったものの、記憶保持障害は有意な改善を示した。

[考 察] 前脳基底部破壊による受動的学習障害は、コリン作動性ニューロンを多数含有する胎仔前脳基底部細胞のクモ膜下腔への移植により、記憶保持の面で有意に改善された。改善の明らかな理由は不明であるが、グラフトからの神経線維の宿主大脳皮質内への進入とシナプス形成の可能性は低く、神経伝達物質やそれらの合成酵素、各種の神経栄養因子などが移植されたニューロンやグリア細胞で産生され、髄液や組織液を介し、また一部は血管新生を伴って血液を介して、拡散性に供給されたことによる可能性が大きいと考えられた。殊にアストロサイトの作用については、生着したニューロンの支持や細胞外マトリックスの形成、グラフト内の微小環境の維持などに関わっている他、NGFなどの神経栄養因子の産生を介して、ホストのコリン作動性ニューロンの生存やsproutingに影響を及ぼしていることが考えられた。脳実質内移植、殊にcavity法ではhyperinnervationによるホストへの悪影響が懸念されるが、クモ膜下腔への移植ではその可能性は低く、さらにグラフトの成育環境からみてもクモ膜下腔は適した移植部位と考えられた。

[結 論]

アルツハイマー病などの脳の変性疾患の治療手段の一つとして、クモ膜下腔への脳組織の移植が考慮され得る。

学位論文審査の結果の要旨

近年、変性したり損傷を受けた中枢神経系に対し、神経移植によって神経回路の再構築ならびに機能回復を図ろうとする試みが注目されている。本研究はコリン作動性神経細胞の変性が重要と考えられているアルツハイマー病に対する神経移植療法を念頭に置いて、移植手技を検討したものである。

実験1では胎仔ラットの前脳基底部組織をパンチアウトし、小組織塊として成ラットの大脳皮質内、側脳室内またはクモ膜下腔に移植した。さらに大脳皮質にcavityを作成し、10日後に移植する“delayed cavity”法とも比較した。クモ膜下腔への移植組織片は脳室内移植と同様成績が良く、また、反応性アストロサイトはクモ膜下腔に面する周辺部および血管周囲に多数集合し、移植片内の微小環境の恒常性維持にかかわっているものと推察された。“delayed cavity”法でも比較的成育が良かったが、部位によっては宿主大脳皮質への著明なhyperinnervationが認められ、宿主神経回路に重大な障害をもたらす可能性が指摘された。

実験2では胎仔ラットの前脳基底部組織を摘出し、メッシュを通してピペッティングで細胞を浮遊化し、その浮遊液をクモ膜下腔に移植した。移植部位では細胞外基質が形成され、神経細胞の発育は非常に良好で、豊富な神経線維を伸展させた。しかし、正常軟膜を貫通して宿主皮質内に進入する線維は確認されなかった。同時に移植されたアストロサイトは神経細胞を支持するだけでなく、微小環境を整え、神経栄養因子を産生するなどの働きを担っているものと考えられた。

クモ膜下腔への浮遊胎仔脳細胞移植の機能回復にかかわる効果を検討するために、実験3では成ラットの一側前脳基底部に興奮アミノ酸であるカイニン酸を注入し、主にコリン作動性神経細胞を変性脱落させた記憶障害モデルを作成し、7日後に実験2と同様にして、同側のクモ膜下腔に移植を行った。移植8週後に明暗箱を用いた受動的回避学習を行い、学習の獲得および記憶保持を、正常未処置群および前脳基底部破壊非移植群と比較して検討した。その結果、移植群では記憶保持の面で有意な改善効果が認められ、その理由としては、移植神経細胞やグリア細胞からの神経伝達物質や神経栄養因子の供給によるところが大であると考えられた。

以上の研究は、複数の種類の神経細胞が変性に陥るアルツハイマー病に対する脳細胞移植療法を考える上で、移植片による神経内分泌的作用を重視し、クモ膜下腔を移植部位とした独創的な実験であり、かつ、神経移植を臨床に応用する場合の移植手技上の効果と危険性に示唆を与えるもので、博士（医学）の学位論文として価値あるものと認められた。